

# The Study of Calcium Ion Contained in Sarcoplasmic Reticulum Fragment of Babbit Skeletal Muscle (兎骨格筋小胞体に存在するCaイ オンに関する研究)

著者	安川 恭子
号	228
発行年	1970
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/23485">http://hdl.handle.net/10097/23485</a>

氏 名・(本籍)	安 川 恭 子
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 2 2 8 号
学位授与年月日	昭和45年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻
学 位 論 文 題 目	The Study of Calcium Ion Contained in Sarcoplasmic Reticulum Fragment of Babbit Skeletal Muscle ( 兎骨格筋小胞体に存在するCa イオンに関する 研究 )
論文審査委員	(主査) 教授 青 木 廉 教授 樋 渡 宏 一 助教授 小 西 和 彦

## 論 文 目 次

### I 緒 論

### II Calcein を用いる蛍光比色法によるCa イオンの定量

- (1) 蛍光比色法によるCa イオンの定量法
- (2) 筋小胞体中のCa イオンの定量

### III 兎骨格筋小胞体に存在するCa イオンについて

- (1) 筋小胞体に存在するCa イオンに及ぼす洗滌効果
- (2) Ca イオンを除去した筋小胞体へのCa イオンの再結合
- (3) Ca イオン除去及び非除去の筋小胞体のATP存在下でのCa イオンのとり込み
- (4) Ca イオン除去及び非除去の筋小胞体のATPase 活性

### IV 結 論

## 論 文 内 容 要 旨

### I 緒 論

兎骨格筋からmicrosome fractionとして得られる sarcoplasmic reticulumの fragment (S. R. F. ) 中に微量の  $\text{Ca}^{++}$  が含まれていることは, Weber ら (1963), Ebashi & Yamanouchi (1964), および Makinose & Hasselbach (1965) らにより指摘されている。S. R. F. に含まれる  $\text{Ca}^{++}$  は筋肉収縮弛緩において制御の役割を担っていることが明らかにされている。一方 S. R. F. が生理的機能をもつために必要な膜構造維持に微量の  $\text{Ca}^{++}$  が寄与していると考えられているが, この点については実験的証拠は得られていない。

著者は, S. R. F. 中の微量の  $\text{Ca}^{++}$  の変動をみるために, Calcein を用いる蛍光比色法による  $\text{Ca}^{++}$  の微量定量法を新しく設定した後, その方法を利用して, 種々の操作を加えた S. R. F. 中の  $\text{Ca}^{++}$  を定量し,  $\text{Ca}^{++}$  量の変動と S. R. F. の ATP,  $\text{Mg}^{++}$  存在下での  $\text{Ca}^{++}$  のとり込み及び ATPase 活性との関係を追求し, S. R. F. 中に存在する  $\text{Ca}^{++}$  は結合様式と S. R. F. における役割から二つの型に区別されることを明らかにした。

本論文はそれらの結果とその検討をまとめたものである。

### II Calcein を用いる蛍光比色法による $\text{Ca}$ イオンの定量

#### (1) 蛍光比色法による $\text{Ca}$ イオンの定量法

S. R. F. 中の微量の  $\text{Ca}^{++}$  を従来用いられている種々な方法によって定量することを試みたが, 測定値の誤差及び定量の限界などのため満足な成績が得られなかった。Wallach らの 3, 6 dihydroxy - 2, 4 - bis [N, N' - (Carboxymethyl) - aminomethyl] fluoran を用いての蛍光比色法による  $\text{Ca}^{++}$  の微量定量法は適用の可能性が認められたが, その試薬は市販されていないので, 市販されている金属指示薬の Calcein で代用することを新しく試みた。

$\text{Ca}$ -Calcein complex はアルカリ性側で蛍光を発し, 特にその際  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  等が共存しても  $\text{Ca}^{++}$  の定量は妨害されなかった。Calcein 溶液を 2N KOH でアルカリ性 (pH 13.4) にした後,  $\text{Ca}^{++}$  を加えた場合と加えない場合の action spectra を Aminco Bowman Spectrophotofluorometer を用いて測定すると,  $\text{Ca}^{++}$  を加えない場合でも加えた場合と同じ 485 m $\mu$  に peak を持ち 460-470 m $\mu$  に小さい shoulder を持つ極度に弱い spectra が得られた。この盲験の spectra は試薬溶液が古くなるほど大であり, 測定の度に試薬を調製する必要が認められ使用する薬品及び器具らの  $\text{Ca}^{++}$  の混入をできるだけ防ぐように努めた結果, 盲験値を十分に低くすることができた。これらの検討を経た後, 定量法を設定した。

$5 \times 10^{-5}$  M Calcein 溶液 1 ml に 2 N KOH 1 ml を加えてアルカリ性にした後,  $10^{-7}$

mole の  $\text{CaCO}_3$  を加え蒸留水で 10ml にしたものゝ蛍光の強さを 100% とし、同様の溶液中の  $\text{CaCO}_3$  の濃度を変えたものゝ蛍光の強さを測定した。なお、蛍光の測定は蛍光装置をつけた Hitachi 139 Spectrophotometer を用い、514.5m $\mu$  の波長で行った。その結果 0.8  $\mu\text{g}$  から 3.6  $\mu\text{g}$  の  $\text{Ca}^{++}$  の範囲で蛍光の強さは直線的に増加するので、上記の条件ではこの範囲の  $\text{Ca}^{++}$  が定量できることがわかった。

## (2) 筋小胞体中の $\text{Ca}$ イオンの定量

上記の方法は安定性はよく、蛋白変性剤である perchloric acid (PCA) の影響は 2% ではないが、同じく蛋白変性剤である trichloro acetic acid (TCA) は影響を及ぼし、エーテルで TCA を除去してもこの影響は除くことが出来なかった。このため S. R. F. の変性剤としては PCA を用いることにした。兎骨格筋から Ebashi らの方法で microsome fraction として調製した S. R. F. を PCA で変性除蛋白後、PCA の終濃度を 2% になるように希釈した試料液の  $\text{Ca}^{++}$  量を上記の方法で定量した。その結果、0.075~0.078  $\mu\text{mole} / \text{mg protein}$  の値が得られ、Ebashi らの成績よりやや高値であるが同じ order の値であって  $\text{Ca}^{++}$  の微量定量として十分に適用できることが認められた。

## II 兎骨格筋小胞体中存在する $\text{Ca}$ イオンについて

### (1) 筋小胞体中存在する $\text{Ca}$ イオンに及ぼす洗滌効果

S. R. F. の  $\text{Ca}^{++}$  の存在様式を明らかにするために、種々の条件のもとでの洗滌効果を検討した。洗滌は 77,400 $\times g$ , 45 分間の遠心分離によった。 $\text{Ca}^{++}$  は上記の Calcein を用いる蛍光比色法で定量したが、S. R. F. を洗う際に使用する遠心管は Polycarbonate 製のものが、洗滌中遠心管からの  $\text{Ca}^{++}$  の逸出が少なく適していた。また蛋白量 20mg の S. R. F. を 0.05M KCl を含む pH 7.5 の 0.02M Tris-acetate buffer で  $\text{Ca}^{++}$  含量が最少になるまで洗うのに 4 回の洗滌が必要であった。

intact 標品の  $\text{Ca}^{++}$  含量は  $\pm 15\%$  の測定誤差で mg protein 当り平均 0.07  $\mu\text{mole}$  であり、pH 7.5 の tris-acetate-KCl buffer で 4 回洗滌 (pH 7.5 洗滌標品) すると  $\text{Ca}^{++}$  含量は 0.021  $\mu\text{mole} / \text{mg protein}$  まで減少した。後者の  $\text{Ca}^{++}$  を S. R. F. にかたく結合している  $\text{Ca}^{++}$  とすると、0.049  $\mu\text{mole} / \text{mg protein}$  の  $\text{Ca}^{++}$  は pH 7.5 の buffer による洗滌で hypotonic shock を受けて medium 中に放出されたとみられ、この  $\text{Ca}^{++}$  はゆるやかに結合している  $\text{Ca}^{++}$  とみなしうる。また S. R. F. を ATP と  $\text{Mg}^{++}$  を含んだ上述の buffer で洗うと 0.040  $\mu\text{mole} / \text{mg protein}$  の  $\text{Ca}^{++}$  量が S. R. F. に残るので、ATP- $\text{Mg}^{++}$  は S. R. F. から  $\text{Ca}^{++}$  が放出されるものを防ぐ効果があるとみられる。ATP- $\text{Mg}^{++}$  によるこのような保持効果から S. R. F. にゆるやかに結合している  $\text{Ca}^{++}$  はむしろ機能的役割をするとみなされる。

次に S. R. F. にかたく結合している  $\text{Ca}^{++}$  は、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  GEDTA を含む pH 7.5 の buffer での洗滌では遊離しないが、pH 5.7 以下の buffer での洗滌では S. R. F. に残っている  $\text{Ca}$  量は著明に減少し ( $0.001 \mu \text{ mole/mg protein}$ )、pH 5.7 から 6.8 の pH 域でこの残存  $\text{Ca}$  量は急激に増加し、pH 7 前後の生理的 pH では最大になる ( $0.016 \mu \text{ mole/mg protein}$ ) 即ち pH 5.7 では pH 7.5 で S. R. F. に結合している  $\text{Ca}$  量の 84 % が遊離した。

(2)  $\text{Ca}$  イオンを除去した筋小胞体への  $\text{Ca}$  イオンの再結合

pH 5.7 の buffer で洗うと S. R. F. 中の  $\text{Ca}^{++}$  はほとんど失われるので、このような S. R. F. を  $\text{Ca}^{++}$  をぬいた S. R. F. ( $\text{Ca}(-)$ 標品)と呼ぶことにした。 $\text{Ca}(-)$ 標品を  $2^\circ\text{C}$  で一晚中  $\text{ATP-Mg}^{++}$  の存在下及び非存在下で、 $10^{-3} \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$  を含む pH 7.5 の Tris-acetate-KCl buffer に incubate した後、 $\text{Ca}^{++}$ -free の pH 7.5 の buffer で 4 回洗うと、 $\text{ATP-Mg}^{++}$  にはほとんど関係なく、ほぼ等しい  $\text{Ca}$  含量の復活がみられ、新しくとり入れられた  $\text{Ca}$  量は pH 7.5 洗滌標品の  $\text{Ca}$  含量の約 79 % であった。この場合の  $\text{Ca}^{++}$  結合は pH 依存性であり、又  $\text{ATP-Mg}^{++}$  なしでも起る。このような S. R. F. を  $\text{Ca}^{++}$  を結合させた S. R. F. ( $\text{Ca}(+)$ 標品)と呼ぶことにした。

(3)  $\text{Ca}$  イオン除去及び非除去の筋小胞体の ATP 存在下での  $\text{Ca}$  イオンのとり込み

一般に S. R. F. は  $\text{ATP-Mg}^{++}$  存在下で急速な  $\text{Ca}^{++}$  とり込みを行うことが知られているので、 $\text{Ca}(-)$ 標品を始めその他の標品について、その 0.1 mg 蛋白量に相当する量を、 $10^{-5} \text{ M}$   $^{45}\text{CaCl}_2$ 、10 mM  $\text{MgCl}_2$  及び 0.1 M KCl を含む pH 6.8 の 0.02 M Tris-maleate buffer 溶液に懸濁させ、2 mM ATP を加え、 $10^\circ\text{C}$ 、 $105,400 \times g$  で 15 分間の遠心分離操作中に  $\text{Ca}^{++}$  のとり込みを行なわせた後、その上清の radioactivity を測定して、ATP 存在下で S. R. F. にとりこまれる  $\text{Ca}^{++}$  量をみた。intact 標品は  $0.077 \mu \text{ mole/mg protein}$  又 pH 7.5 洗滌標品は  $0.060 \mu \text{ mole/mg protein}$  という高い  $\text{Ca}$  とり込みを示すのに反して、 $\text{Ca}(-)$ 標品はわずかに  $0.004 \mu \text{ mole/mg protein}$  である。 $\text{Ca}(+)$ 標品は明らかに  $\text{Ca}^{++}$  とり込みを行い、その量は  $0.027 \mu \text{ mole/mg protein}$  である。

これらの結果から、ATP 存在下の  $\text{Ca}^{++}$  とり込みの際には、S. R. F. 標品に  $\text{Ca}^{++}$  がかたく結合していることが必要であり、又この  $\text{Ca}^{++}$  は S. R. F. が機能を果すのにふさわしい構造を保つためにその構造体中に含まれていると考えられる。

しかし  $\text{Ca}(+)$ 標品の  $\text{Ca}^{++}$  とり込みの回復が 100 % でない事実から、それらは ATP 依存性の  $\text{Ca}^{++}$  とり込みの機能を十分に果すほどの構造には戻らず、S. R. F. 中に  $\text{Ca}^{++}$  を保持させないであろうとみなされる。従って、S. R. F. は  $\text{Ca}^{++}$  を除去する操作を受けるとその構造は部分的に損傷を受け、それに  $\text{Ca}^{++}$  を与えても完全には回復しないとみられる。

(4)  $\text{Ca}$  イオン除去及び非除去の筋小胞体の ATPase 活性

S. R. F. は  $\text{Ca}^{++}$  によって活性化される  $\text{Mg}^{++}$  依存性 ATPase 活性を示すことが知られて

いるので、種々のS. R. F. 標品について、そのATPase 活性を、pH 6.8 の20mM Tris-maleate buffer, 1mM  $MgCl_2$ , 60mM KCl,  $10^{-4}$  M GEDTA, 各濃度の $CaCl_2$ , 1mM ATP 及びS. R. F. (0.05mg protein/ml)を含む反応液を、28°Cで10分間反応させて測定した。いずれのS. R. F. 標品でもATPase 活性は $10^{-4}$  Mの $Ca^{++}$  至適濃度を示し、 $10^{-4}$  M  $CaCl_2$  の存在下で遊離されるPiはmg proteinあたり、intact 標品で0.88  $\mu$  mole, pH 7.5 洗滌標品は1.14  $\mu$  mole, Ca(-)標品は0.56  $\mu$  mole, Ca(+)標品は0.52  $\mu$  moleであった。Ca(-)標品でも明らかにATPase 活性を示し、他の標品と同じCa 至適濃度を示すので、ATPase 賦活に関係する $Ca^{++}$  は添加した $Ca^{++}$  に依存すると考えられる。

次にpH 7.5 のbufferに懸濁した各々のS. R. F. 標品を2°Cで5日間貯蔵して、 $10^{-4}$  M GEDTA 存在下及び非存在下において、 $Mg^{++}$  依存性ATPase 活性を測定して、それぞれの標品の貯蔵効果を検討した。貯蔵の間にGEDTA無添加でのATPase 活性は、intact 標品とpH 7.5 洗滌の標品では増大するのに反して、Ca(-)標品とCa(+)では減少した。同様の変化はGEDTA存在下でもわずかながらみられた。又Ca(-)標品のATPase 活性は調製直後にはかなり高いが、GEDTA存在下において各々の標品の活性は殆んど差異がなかった。Ca(-)標品はATP 存在下での $Ca^{++}$ とり込みがほとんどないのでATPase測定の際に同時に起るCaとり込みがなく、従って、GEDTA非存在下の高い初期の活性を示すとみなされる。

#### IV 結 論

強アルカリ性で蛍光性のCa-Calcein-complexをつくることに基ずいて、新しくCalceinを使用する蛍光比色法による $Ca^{++}$ の微量定量法を設定したが、この方法によって0.8  $\mu$ gから3.6  $\mu$ gの範囲の $Ca^{++}$ が測定できた。この方法を適用する際には、微量の $Ca^{++}$ の混入を防ぐことが必要であるが、共存する $Mg^{++}$ の影響をうけず、兎骨格筋のsarcoplasmic reticulum fragment (S. R. F.)中のCa含量の測定に十分に適用しえた。

S. R. F. 中のCa含量は平均0.07  $\mu$  mole/mg proteinであり、S. R. F.をpH 7.5のTris-acetate-KCl bufferで4回洗うと、その約2/7は洗滌後のS. R. F.に残った。この $Ca^{++}$ はpH 5.7のacetate-KCl bufferではほとんど洗い流されるが、GEDTA添加のpH 7.5のbufferでは洗滌されない。即ちpH 7.5で遊離する $Ca^{++}$ とpH 5.7で遊離する $Ca^{++}$ に分けられ、前者はゆるやかに、後者はかたく結合している $Ca^{++}$ とした。pH 5.7洗滌のS. R. F. 標品に $Ca^{++}$ を加えると再び $Ca^{++}$ が結合して、ほとんどもとの $Ca^{++}$ 量に回復した。

ATP 存在下での $Ca^{++}$ とり込みは、 $Ca^{++}$ を再結合させたS. R. F. 標品でintact 標品やpH 7.5洗滌標品と同様に行なわれるが、pH 5.7洗滌で $Ca^{++}$ を除いた標品ではみられない。即ち、ATP 依存性の $Ca^{++}$ とり込みにはかたく結合している $Ca^{++}$ の存在が必要であることを認めた。

これに反して、 $Mg^{++}$ 依存性のATPase 活性はいずれのS. R. F. 標品でも認められ、いずれの

標品でも  $10^{-4}\text{M}$   $\text{Ca}^{++}$  で最高活性を示し、 $\text{Mg}^{++}$  依存性の ATPase 活性には、かたく S. R. F. に結合している  $\text{Ca}^{++}$  は必要ではなかった。各々の S. R. F. 標品を貯蔵すると Ca-attenuation をうけた標品はいずれも ATPase 活性が減少するのに反して、intact の標品や pH 7.5 洗滌の標品は逆にその活性が増大した。この事実からもかたく結合する  $\text{Ca}^{++}$  は構造的な  $\text{Ca}^{++}$  として、ゆるやかに結合している  $\text{Ca}^{++}$  と区別しうることを認めた。

## 論文審査結果の要旨

筋肉の収縮弛緩に重要な役割を持つ  $\text{Ca}^{++}$  の細胞体内での行動を制御しているのが筋小胞体である。この制御機構には現在不明の点が多い。この点を明らかにする一つの方向は筋小胞体自体と  $\text{Ca}^{++}$  との関係を明確にすることである。現在筋小胞体にもある量の  $\text{Ca}$  が含まれており、その一部は固く、一部は緩かに結合していると考えられているが、その実験的根拠は極めて不十分である。この点を実験的に明らかにする目的で行われたのが本論文である。

在来の  $\text{Ca}$  微量定量法はいずれも欠陥があり、本実験には適さないことが判明した。安川は新に金属指示薬 calcein の  $\text{Ca}$ -complex の発する蛍光を利用し、適当の条件の下では  $0.8 \sim 3.6 \mu\text{g}$   $\text{Ca}^{++}$  の範囲内では蛍光の強さは  $\text{Ca}^{++}$  濃度に対し直線的に増加することを確め、新たな  $\text{Ca}$  微量定量法を確立した。この方法の確立により以下の実験が可能になったのである。

筋小胞体中の  $\text{Ca}$  量は平均  $0.07 \mu\text{mole/mg}$  蛋白質である。この  $\text{Ca}^{++}$  の小胞体中での結合の強さを測るため洗滌効果を調べた。pH7.5 緩衝液では含まれている  $\text{Ca}^{++}$  の  $5/7$  は 4 回の洗滌で洗い去られるが、残りの  $2/7$  は HEDTA を含む pH7.5 の緩衝液でも遊離されず、pH7.5 の緩衝液ではじめて、ほとんど遊離する。この  $2/7$  に当る  $\text{Ca}^{++}$  の結合はかなり強いもので、一度離れた後は外部より  $\text{Ca}^{++}$  を与えても完全には元のように恢復しない。

一方筋小胞体は  $\text{Mg}^{++}$  , ATP 存在の下では  $\text{Ca}^{++}$  を積極的に取りこむものである。この場合、種々の実験の結果、小胞体中の  $2/7$  に当る  $\text{Ca}^{++}$  の存在することが  $\text{Ca}^{++}$  取りこみに必要条件であることが明らかにされた。また筋小胞体の有する  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 活性自体はこの  $2/7$  に当る  $\text{Ca}^{++}$  の存否に関係なく、外囲の  $[\text{Ca}^{++}]$  にのみ左右されることも確認された。

以上の結果から小胞体中の  $\text{Ca}^{++}$  の  $2/7$  は筋小胞体が機能を営むために必要な構造を維持するのに役立っているものであり、残りの  $5/7$  の  $\text{Ca}^{++}$  は直接構造に関係なく、極めてルーズに結合しているもので、作用的のものであろうとの結論に達した。

安川のこの研究は筋小胞体の働きについて一新知見を加えたもので、この方面の研究発展に寄与するところは大きいと考える。よって安川恭子提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。